IMMUNOGENITÄT DES VIRUS "MVA"
(Modifiziertes Vaccinevirus Ankara)

Ingbert Freytag

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546014_0067

AUS DER BAYERISCHEN LANDESIMPFANSTALT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. Stickl

IMMUNOGENITÄT DES VIRUS "MVA"

(MODIFIZIERTES VACCINEVIRUS ANKARA)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ingbert Freytag

aus München

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Stickl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Spann
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.7.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Immunogenität des Virus "MVA"

(Modifiziertes Vaccinecirus Ankara)

Disposition

I. Einleitung

Die Grundlage der Pockenschutzimpfung
Versuche, Vaccinevirus zu attenuieren
Entstehungsgeschichte des Virus MVA

II. Material und Methoden

Virus
Virusnachweis und Virustitration
Versuchstiere
Verlauf der cutanen und intracutanen Wiederimpfung
Nachweis von Serumantikörpern
Nachweis der Gewebeimmunität
Immuntransfer

III. Durchführung und Ergebnisse der Versuche

1. Der Verlauf der cutanen und intracutanen Immunisierung am Kaninchen
2. Immuntransfer von immunen erwachsenen Mäusen auf nicht immune Säuglingsmäuse
3. Immuntransfer auf die Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Schrifttum

I. Einleitung

Genetisch stabile Eigenschaften, die ein Virus bei der Infektion eines Organismus entwickelt, sogenannte Marker, die bei genau eingehaltenen Kulturbedingungen für jedes Virus spezifisch sind, können zu dessen Identifizierung und Einordnung dienen. Das Vaccinevirus, das Variolavirus und die verschiedenen Tierpockenviren bilden eine Gruppe, die sich exakt durch die Marker ihrer Viren einteilen läßt.

Auch ein Virus, das aus einem anderen durch Veränderungen seines Wirtsmediums hervorgegangen ist, unterscheidet sich in seinen Markern oft beträchtlich von seinem Urvirus.

Diese Tatsache gab zu der Theorie Anlaß, die Viren der Pockengruppe hätten ein gemeinsames Urvirus, möglicherweise eines aus der Gruppe, aus dem sie sich entwickelt hätten (15).

Ein wichtiger Marker ist die Antigenität untereinander. So ist der Marker 'gekreuzte Antigenität der Vacciniaviren zum Variolavirus' die Basis der Impfung gegen Variola, weil eine in der Regel leicht zu überwindende Infektion mit dem Vaccinevirus eine gewisse Immunität gegen Variola mit sich bringt.

Leider ist dieser Marker des Vaccinia-Virus nicht der einzige; ein anderer ist eine gewisse Pathogenität für den Menschen, und da er wie alle anderen Marker eine gleichbleibende Eigenschaft darstellt, hängt es von der Fähigkeit des einzelnen Impflings ab, ob er die Impfung ohne nachteilige Folgen übersteht.

Nachdem man wußte, daß sich die Eigenschaften eines Virus durch abgewandelte Kulturbedingungen verändern können, lag es nahe, ein Vaccinevirus so zu 'attenuieren', daß es seine Fähigkeit zur Immunisierung gegen Variola so weitgehend wie möglich behielt, den Marker 'Pathogenität gegen den Menschen'

aber verlor. Auch eine gefahrlose Immunisierung gegen das stärker athogene aber möglicherweise besser immunisierende Vaccinevirus konnte von Nutzen sein.

Als Erster beschritt RIVERS 1933 diesen Weg der Attenuierung.

Seine eigentliche Absicht war gewesen, eine bakterienfreie Vakzine herzustellen, als er begann, den Stamm des New York City Board of Health in Röhrchenkulturen von Hühnerembryo-Fibroblasten zu vermehren (19).

Das Virus, das RIVERS dann verimpfte, zeigte eine stark verminderte Pathogenität, aber auch, wie die Wiederimpfung mit herkömmlicher Vakzine zeigte, eine ungenügende Immunität.

Dieses Virus vermehrte RIVERS nach 34 Passagen auf den Hühnerembryo-Fibroblasten noch 6mal in Kaninchenhoden. Er nannte es 'first revived strain' (20); PARKER, der sich später damit beschäftigte, nannte das Virus CV 1 (18).

Unter den Händen von PARKER und KEMPE durchlief das Virus CV 1dann 72 Serienpassagen auf der Chorionallantoismembran (CAM) bebrüteter Hühnereier (10).

JOHN untersuchte es danach auf seine Eigenschaften in der Zellkultur (8) und an Eiern und Mäusen (9).

Er fand dabei eine gesteigerte Virulenz in der Zellkultur, im Hühnerei und im Gehirn von jungen Mäusen.

Auch VAN DER NOORDAA benützte das Virus von RIVERS. Er vermehrte es auf der CAM von Eiern und gewann daraus eine Vaccine, die er zur Vorvakzination von Rekruten benützte (17). Die Höhe der danach erreichten Antikörpertiter war zwar geringer als nach Impfung mit herkömmlichem Virus, gleichzeitig war die Reaktion milder, und eine nachfolgende Impfung mit herkömmlicher Vakzine zeigte eine typische Wiederimpfreaktion. VAN DER

NOORDAA nannte dieses Virus "CV 2".

Geschichte von MVA

Im Jahre 1954 führten HERRLICH und MAYR vergleichende Arbeiten über das Vaccinia-Virus durch (4).

Unter den zahlreichen untersuchten Viren aus verschiedenen Impfanstalten befand sich auch das Vaccinia-Virus, Stamm Ankara. Seine Eigenschaften wurden am Hühnerembryo und auf der Kaninchenhaut beobachtet.

Es fiel dabei auf durch seine deutliche Neigung zur Generalisation am Hühnerembryo und seine milde Reaktion ohne Nekrosen auch bei hohen Dosen auf der Kaninchenhaut. Beim Menschen machte die Vakzine eine kräftige Reaktion und häufig Nebenpocken.

MAYR vermehrte das Virus nach dem Vorbild RIVERS' in Kulturen von Hühnerembryo-Fibroblasten und Schweinenierenzellen. Nach der 300. Passage beschrieb er es im Rahmen einer anderen Arbeit (15).

Gegenwärtig liegt das Virus von den Hühnerfibroblasten (FHE) in der 517. Passage vor, die in der Bayer. Landesimpfanstalt noch 4mal fortgeführt wurde (FHE 517/IV) und in der 495. Passage auf Schweinenierenzellen (ENS 495) in Primärkultur. Das von FHE 517/IV ab beim Menschen verwendete, modifizierte Vaccinia-Virus wurde "MVA-Virus" beziehungsweise "MVA-Impfstoff" genannt (Modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara).

Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Versuche sollen die folgenden Eigenschaften des MVA-Virus beziehungsweise des FHE- und ENS-Virus zeigen und vergleichen:

1. Humorale und Gewebsimmunität nach cutaner und intracutaner Immunisierung am Kaninchen

2. Reaktion auf der Kaninchenhaut
3. Immunreaktion bei Wiederimpfung mit herkömmlicher Vakzine (ELSTREE)
4. Immuntransfer passiv und adoptiv auf Säuglingsmäuse
5. Immuntransfer auf den Hühnerembryo

II. Material und Methoden

-Virus: MVA, modifiziertes Vacciniavirus Ankara, wurde das Virus FHE genannt, nachdem es in der Bayer. Landesimpfanstalt München, ausgehend von der 517. Passage noch viermal in Hühnerfibroblasten-Kulturen vermehrt worden war (517/IV). Zu den Versuchen wurde es noch drei- bzw. viermal auf der Chorionallantoismembran (CAM) elftägiger embryonierter Hühnereier vermehrt. Die Membranen wurden steril gewonnen, gefroren und zerrieben. Das gewonnene Material wurde jeweils auf mehrere Röhrchen verteilt, um es zu titrieren, ohne den ganzen Vorrat auftauen zu müssen.

ENS, Vaccinevirus Stamm Ankara in der 495. Passage auf Schweinenierenzellen in Primärkultur:

dieses Virus wurde nur auf der CAM austitriert, nicht vermehrt. Zur Verwendung kam das Virus auf der Zellkultur.

Vakzinevirus Stamm ELSTREE aus der laufenden Produktion der Bayer. Landesimpfanstalt München als Trockenimpfstoff. Die Bezeichnung der jeweiligen Charge ist bei den einzelnen Versuchen angegeben.

-Virusnachweis und Virustitration wurden auf der Chorionallantoismembran (CAM) elftätiger embryonierter Hühnereier durchgeführt:

Die CAM wurde gesenkt, und auf sie wurden jeweils 0,1 ml einer Virussuspension verimpft. Danach wurde die Schale wieder mit einem Paraffintropfen verschlossen. Nach weiterer zweitägiger Inkubation wurden die CAM gewonnen und die Herde ausgezählt.

-Versuchstiere: Weibliche Neuseeländer Kaninchen, Inzucht-Albinos von 1,5 bis 2 kg Gewicht. Die Tiere wurden mit handelsüblichem Trokkenfutter und Wasser ernährt.

Erwachsene weiße Mäuse vom Stamm NMRI, 15 bis 20 g schwer, Ernährung mit Trockenfutter und Wasser.

Junge weiße Mäuse im Alter von 3 bis 8 Tagen. Es wurden gedeckte weibliche Mäuse bezogen, etwa in der Mitte der Trächtigkeit, und der Beginn des Versuches so eingerichtet, daß die Mäusemütter geworfen hatten und sich die jungen Tiere im richtigen Alter befanden.

-Verlauf der cutanen und intracutanen Impfung:

Der Verlauf der cutanen Impfung auf der Kaninchenhaut wurde nach MAHNEL (12) beurteilt:

Erstimpfung: Die Schnittschorfe fallen am 2. Tag ab, am 4. Tag zeigt sich eine spezifische Rötung, am 5. Tag ein Papel- und ein kurzes Bläschenstadium und am 6. - 7. Tag entstehen Pusteln. Diese trocknen am 8. - 9. Tag ein, die Schorfe fallen nicht vor dem 20. Tag ab.

Immunitätsreaktion: Am 2. Tag Abfall der Schnittschorfe, die Infiltration ist gering. Am 3. - 4. Tag bilden sich kleine Bläschen, die nach wenigen Stunden eintrocknen.

Die entstehenden dünnen Strichschorfe beginnen am 5. Tag abzufallen.

Der Verlauf der intracutanen Impfung und Nachimpfung wurde an der Dicke der Hautinfiltrate verfolgt. Die Haut wurde mit der Quaddel angehoben und die Dicke mit Hilfe einer Schublehre mit breiten Auflageflächen gemessen.

-Nachweis der humoralen Immunität:

Als Maßstab für die humorale Immunität wurde die Hämaggluti-

nationshemmung (21) nach HIRST (6) in der Modifikation nach MAYR (14) beobachtet.

Die Hühnererythrozyten wurden frisch aus der Flügelvene gewonnen, gewaschen, und es wurde eine 0,5 %ige Suspension in 0,9 % Kochsalzlösung hergestellt.

Nach Auswertung des Testantigens (4HE), wurde die Serumverdünnung in negativen 2er Potenzen, beginnend bei 1 : 4, angesetzt.

Bestimmend ist der Titer der Verdünnung, in der die Agglutination der Erythrozyten noch einwandfrei gehemmt ist.

-Nachweis der Gewebeimmunität:

Der Nachweis der Vakzinia-spezifischen Gewebeimmunität erfolgte durch die Methode der Leukozytolyse nach STICKL und ENGELHARDT (22).

Das Blut der immunisierten Kaninchen wurde durch Punktion aus der Ohrvene gewonnen und heparinisiert (500 IE Heparin/ml Vollblut). Es wurde dann in U-förmige Glaskapillaren gefüllt, diese mit einem Paraffintropfen verschlossen und 2mal 5 min. bei 300 Upm zentrifugiert.

Die Kapillaren wurden an der Grenze zwischen der Erythrozyten- und der darüberliegenden Leukozytenschicht durchsägt. Das so abgetrennte Gemisch aus Leukozyten und Plasma wurde in ein kleines Blockschälchen gegeben und gleichmäßig gemischt. In ein dicht verschließbares Röhrchen wurden 0,2 ml dieses Gemisches und 0,1 ml Gewebekulturvirussuspension (Titer 5×10^8 VE/ml) pipettiert. Im Kontrollansatz wurde statt des Virus 0,1 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung verwendet.

Zu jedem Versuch wurden auch Leukozyten nicht immuner Tiere angesetzt. Die Röhrchen wurden mit einem Gummistopfen dicht ver-

schlossen und 4 Stunden bei 37 Grad inkubiert.

Die Leukozyten wurden vor und nach der Inkubation in der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt.

-Der Immuntransfer von immunen Spendern auf die CAM bebrüteter Hühnereier (22, 23, 24) und auf nicht immune Säuglingsmäuse sollte dazu dienen, die immunogene Wirkung des Virus MVA und des Vaccinia-Virus ELSTREE zu vergleichen.

Zum Transfer auf CAM wurde die genau eingestellte Zahl von Milzzellen (genaue Zahlen beim jeweiligen Versuch) auf die CAM gegeben und eine Stunde darauf die Belastungsinfektion mit Vaccinia-Virus, Stamm ELSTREE, durchgeführt. Die Ernte und Auswertung der CAM erfolgten wie die Titrierung und der Virusnachweis.

Im Transfer auf Säuglingsmäuse (7) kam der Vergleich zwischen adoptiver und passiver Immunisierung (11, 5) hinzu. Die Infektion der Mäuse erfolgte 24 Stunden nach der Verabreichung von Serum bzw. Zellen.

III. Durchführung und Ergebnisse der Versuche

I. Aktive Immunisierung am Kaninchen

Verwendet wurden insgesamt 20 Kaninchen, von denen als Kontrolle 5 unbehandelt blieben.

Die übrigen 15 Tiere wurden am Rücken enthaart und in folgender Weise mit den 3 zur Verfügung stehenden Viren immunisiert:

		Tier-Nr.:				
	MVA	131	130	129	128	127
	ENS	136	135	134	133	132
	ELSTREE	200	140	139	138	137

Verimpft wurde Virus FHE 517/IV, 3. Eipassage (= MVA-Impfstoff)

Virus ENS 495. Passage auf Schweinenierenzellen

Virus ELSTREE Trockenimpfstoff 117 ER

Der Titer der Viren war bekannt und es wurde eine Suspension hergestellt mit 10^7 VE/ml bei FHE und ELSTREE, die Konzentration bei ENS war nicht höher als 10^5 VE/ml.

Nach Verdünnung in negativen Zehnerpotenzen stand zur Verfügung:

FHE (= MVA)	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	VE/ml
ENS			10^5	10^4	10^3	10^2	VE/ml
ELSTREE	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	VE/ml

Auf der einen Hälfte des enthaarten Rückens wurden die Impfschnitte in allen Verdünnungen ausgeführt, auf der anderen die intracutanen Injektionen von je 0,1 ml.

Schema zur Beobachtung der Reaktion nach der Immunisierung der Versuchstiere

1. Tag Immunisierung der Tiere
Beobachtung der Schnitte und Messung der Quaddelstärken.
Generalisationsproben.

14. Tag Blutabnahme und Bestimmung des HAH-Titers

21. Tag Blutabnahme, 2. Bestimmung des HAH-Titers

Wiederimpfung und Beobachtung der Wiederimpfreaktion

a) Quaddelstärke nach der Erstimpfung

Bild 1

Mittelwert der 3 Versuchskollektive

bei 10^7 VE/ml

Tage p.V.	0	1	2	3	5	6	7	8
ELSTREE	2,0	5,3	7,6	7,5	5,0	4,8	4,5	4,4
FHE (= MVA)	2,2	4,8	7,4	6,8	3,7	3,6	3,8	3,6

und 10^6 VE/ml

Tage p.V.	0	1	2	3	5	6	7	8
ELSTREE	2,0	4,2	6,6	6,4	3,8	4,2	3,7	3,7
FHE (= MVA)	2,2	4,2	7,5	7,2	4,1	4,1	4,1	4,1

Bild 2

Quaddelstärke bei 10^5 VE/ml

Tage p.V.	0	1	2	3	5	6	7	8
ELSTREE	2,0	3,5	5,6	5,5	3,4	3,1	3,0	2,0
FHE (= MVA)	2,2	3,8	6,7	6,2	5,4	5,3	4,6	4,6
ENS	2,4	4,6	5,2	3,8	3,2	3,0	3,0	3,0

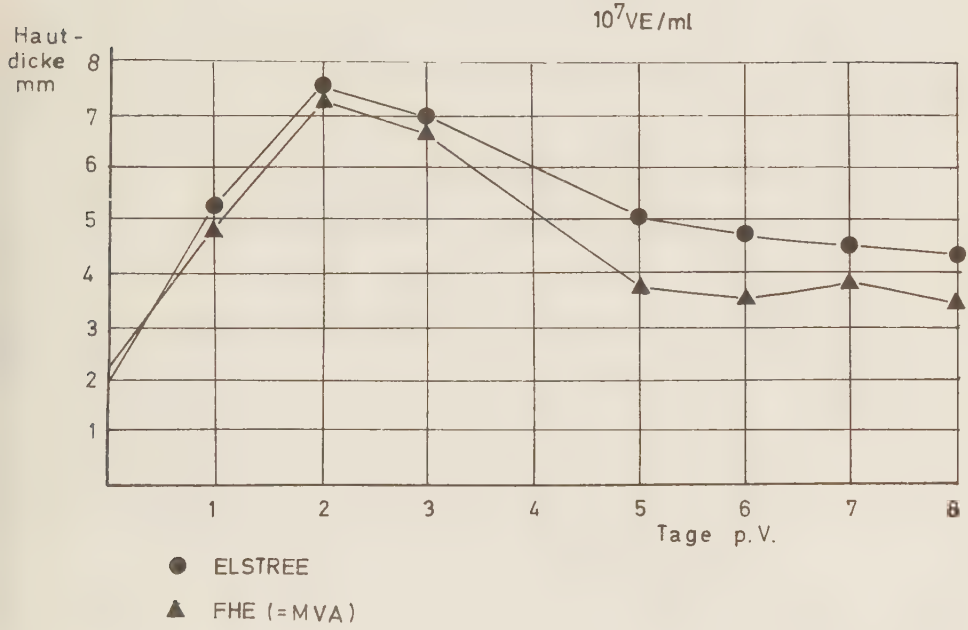
10^4 VE/ml

Tage p.V.	0	1	2	3	5	6	7	8
ELSTREE	2,0	2,5	4,4	4,6	3,0	3,1	2,8	2,8
FHE (= MVA)	2,2	3,2	5,5	6,0	4,5	4,2	4,2	3,8
ENS	2,4	3,8	4,8	4,0	3,1	2,8	2,5	2,5

10^3 VE/ml

Tage p.V.	0	1	2	3	5	6	7	8
ELSTREE	2,0	2,3	3,8	3,9	3,0	3,2	2,5	2,5
FHE (= MVA)	2,2	3,0	3,9	4,0	3,4	3,5	3,5	3,5
ENS	2,4	3,2	3,5	3,1	2,7	2,8	2,5	2,5

Bild 3 Verlauf der Quaddelstärken an den Tagen nach der Immunisierung



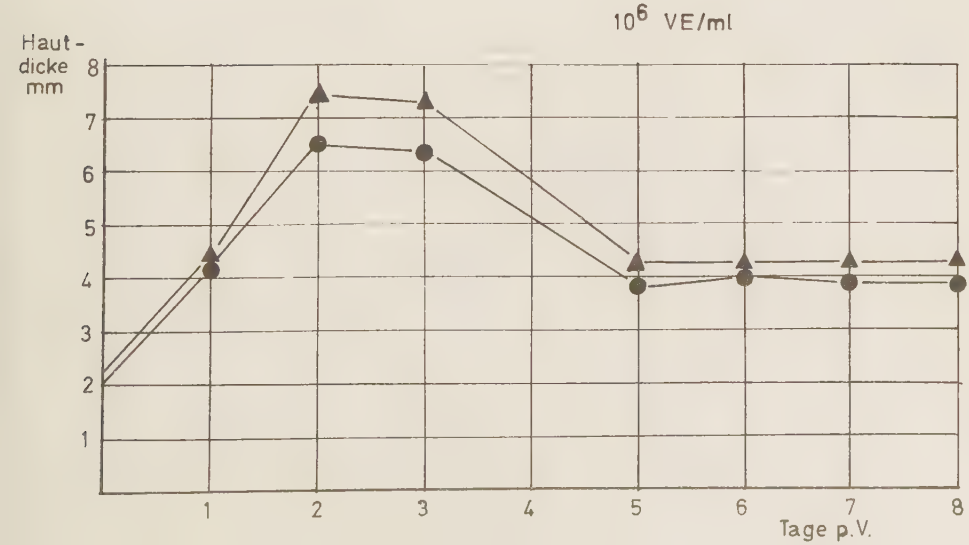
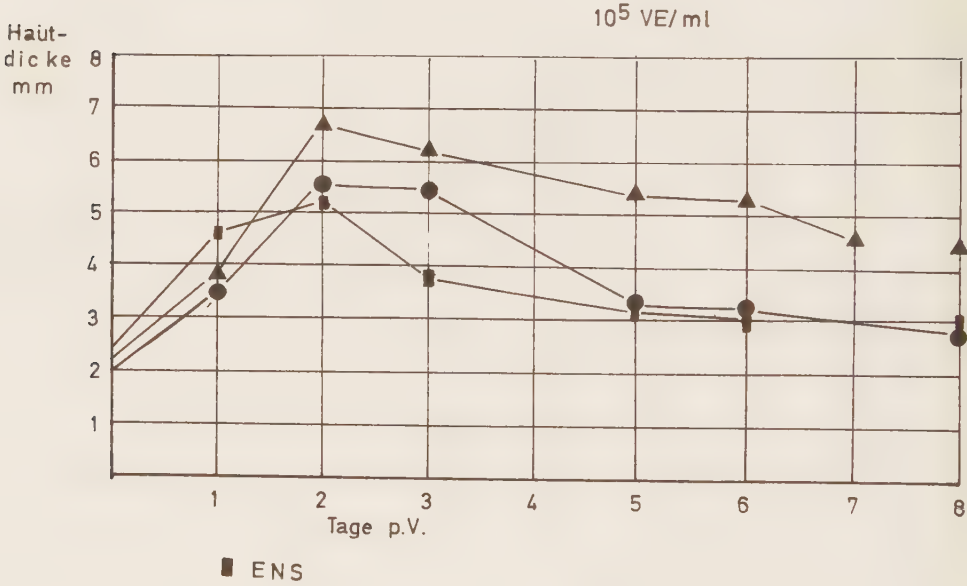
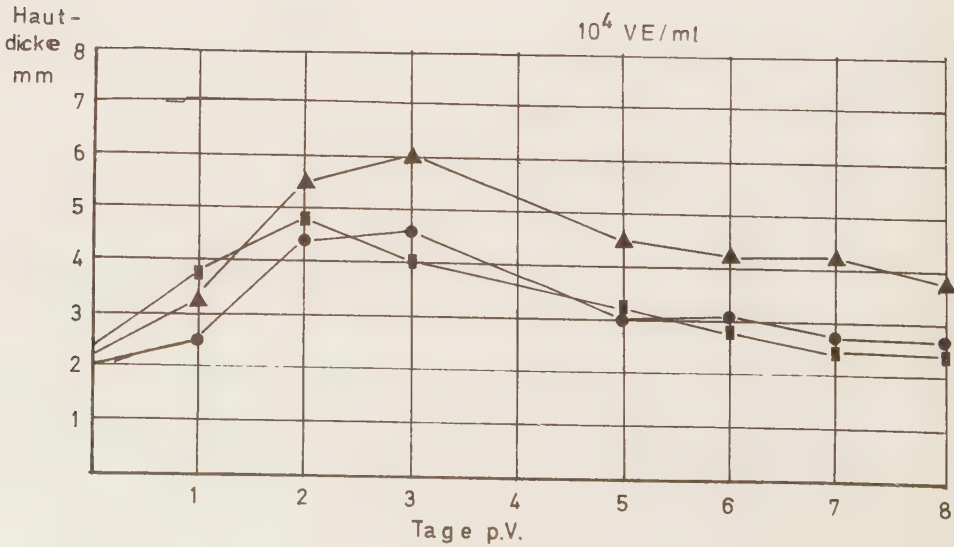


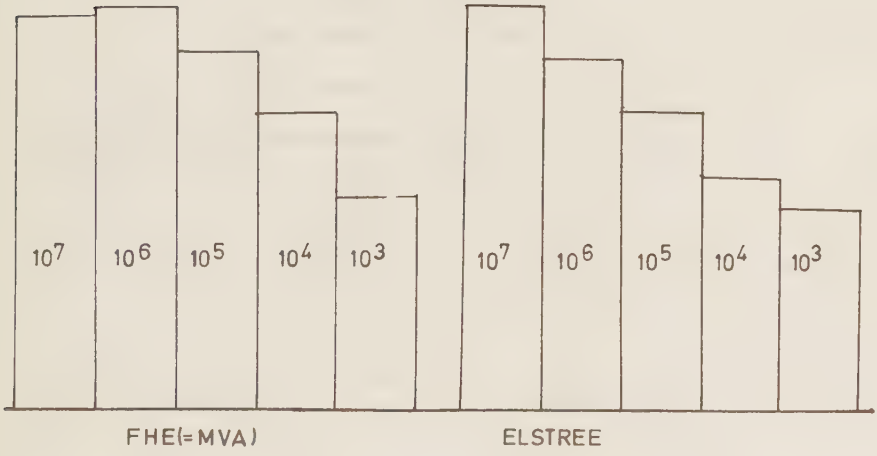
Bild 4 Verlauf der Quaddelstärken an den Tagen nach Immunisierung





Die Quaddelstärken des Vacciniavirus ELSTREE zeigten einen gleichmäßig abfallenden Wert von der höchsten zur niedrigsten Konzentration, FHE dagegen nicht nur keinen Abfall, sondern einen deutlichen Gipfel der Reaktion bei der zweithöchsten Konzentration, bei 10^6 VE/ml, wie aus Bild 5 ersichtlich.

Bild 5 Die Graphik zeigt die Werte des 2. Tages, an dem die Unterschiede am ausgeprägtesten waren.



b) Hautveränderungen an den Quaddeln nach der Erstimpfung

1. Tag p. V. mit 3. Tag		unspezifische Rötung, dann Schwellung und Induration bei allen Tieren
4. Tag	FHE (= MVA):	Haut straff gespannt, Rand gerötet, Zentrum weiß, glänzend (leichte Exsudation)
	ENS:	Induration, gleichmäßige Rötung
	ELSTREE:	Haut straff gespannt, Rötung
5. Tag	FHE (= MVA):	Ohne vorherige Pustelbildung tiefe zentrale Nekrose mit wallartigem Rand und hämorrhagischem Charakter. Durchmesser cirka 8 mm. Beginnende Verschorfung.
	ENS:	Rötung, Induration, leichte Verkrustung
	ELSTREE:	Induration, kleine zentrale Nekrose ohne hämorrhagischen Charakter, beginnende Verschorfung.

6. Tag p. V. sämtliche Veränderungen sind voll ausgeprägt.

Bild 6 Hautveränderungen in Bezug zur Konzentration

	Tier-Nr.	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3 VE/ml
FHE (= MVA)	131	S	S	S	I	ø
	130	S	S	S	S	ø
	129	S	S	S	I	ø
	128	S	S	S	S	ø
	127	S	S	S	I	ø
ENS	136	-	-	I+K	R	ø
	135	-	-	I	I	ø
	134	-	-	I+K	R	ø
	133	-	-	I	R	ø
	132	-	-	I	R	ø
ELSTREE	200	S	S	S	ø	ø
	140	S	S	S	ø	ø
	139	S	I	I	ø	ø
	138	S	S	I	ø	ø
	137	S	I	I	ø	ø

- keine Quaddel in dieser Konzentration ausgeführt

ø nicht angegangen

R Rötung

I Induration

K Kruste

S Schorf

Die Schorfe der mit FHE (= MVA) immunisierten Tiere hafteten sehr fest und waren sehr schwer zu entfernen. Sie reichten zapfenförmig tief in die Haut. Sie lösten sich selbst nur sehr langsam von der Haut ab, so daß am 27. Tag nach der Immunisierung, als die Tiere zur Wiederimpfung erneut enthaart wurden, noch letzte Reste vorhanden waren.

Die leichten Krusten auf einigen Quaddeln der ENS-Versuchstiere verschwanden um den 9. Tag p. V..

Die Schorfe der ELSTREE-immunen Tiere begannen am 9. Tag p. V. abzufallen.

c) Angehen der Impfschnitte

Bild 7 Angehen der Impfschnitte in Abhängigkeit von der Konzentration

	Tier-Nr.	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2 VE/ml
FHE (= MVA)	131	+	+	+	+	+	Ø
	130	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	129	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	128	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	127	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
ENS	136			+	+	+	+
	135			+	+	Ø	Ø
	134			+	+	+	+
	133			+	+	+	Ø
	132			+	+	Ø	Ø
ELSTREE	200	+	+	+	+	Ø	Ø
	140	+	+	+	+	Ø	+
	139	+	+	+	Ø	Ø	+
	138	+	+	+	+	+	Ø
	137	+	+	+	+	+	Ø

\+ Impfschnitt angegangen

Ø Impfschnitt nicht angegangen

d) Hautveränderungen an den Schnitten nach der Erstimpfung

Bild 8 Hautveränderungen an Schnitten

mit 10^7 VE/ml

Tag p. V.	FHE (= MVA)	ELSTREE
1	unspezifische Reizung	
2	Schnitt verkrustet	
3	Schwellung, Rötung, Induration	
4	Schwellung, Rötung	Pustelbildung
5	runde nekrotische Herde, konfluierend	Verschorfung, runde konfluierende Herde
6	Schorfe haften fest	Schorfe haften fest
9	Schorfe bleiben	Schorfe fallen ab
27	letzte Schorfreste	Haut intakt

mit 10^6 VE/ml

Tag p. V.	FHE (= MVA)	ELSTREE
1	unspezifische Reizung	
2	Schnitte verkrusten	
3	Schwellung, Rötung, Induration	
4	Papelbildung	Pustelbildung
5	runde nekrotische Herde, konfluierend	Verschorfung, konfluierend
6	Schorfe haften fest	Schorfe haften
9	Schorfe haften	Schorfe fallen ab
27	letzte Schorfreste	Haut intakt

Bild 9 Hautveränderungen an Schnitten

mit 10^5 VE/ml

Tag p. V.	FHE (= MVA)	ENS	ELSTREE
1	unspezifische Reizung		
2	Schnitt verkrustet		
3	Schwellung, Rötung		
4	1 Tier mit Papel	Rötung, Schwellung	Pustelbildung
5	Schorf	dünner Strichschorf	Induration, Schorf
6	Schorf haftet	Schorf haftet fest	
9	Schorf haftet	Schorfe fallen ab	
27	Schorfe abgefallen, Haut intakt, starker Haarwuchs		

mit 10^4 VE/ml

Tag p. V.	FHE (= MVA)	ENS	ELSTREE
1	unspezifische Reizung		
2	Schnitt verkrustet		
3	Schwellung, Rötung, leichte Induration		
4	1 Tier mit Papel	Rötung, Schwellung	Pustelbildung
5	1 runder Schorf	Strichschorf	Schorf
6	Schorf haftet	Schorf haftet	Schorf haftet
9	Schorfe abgefallen, Haut intakt, Haarwuchs beginnt		
27	Haut intakt, starker Haarwuchs		

Bild 10 Hautveränderungen an Schnitten

mit 10^3 VE/ml

Tag p. V.	FHE (= MVA)	ENS	ELSTREE
1		unspezifische Reizung	
2		Schnitte verkrustet	
3		leichte Rötung, Schwellung und Induration	
4	1 Tier mit Papel	Rötung, Schwellung	Pustelbildung
5	1 runder Schorf	dünner Strichschorf	Schorf
6	Schorf haftet	Schorf fällt ab	Schorf fällt ab
9		alle Schorfe abgefallen, Haarwuchs	
27		Haut intakt, starker Haarwuchs	

mit 10^2 VE/ml

Tag p. V.	FHE (= MVA)	ENS	ELSTREE
1		leichte Reizung	
2		Schnitte verkrustet	
3		leichte Rötung und Schwellung	
4	nicht mehr	Rötung, Schwellung	2 Tiere mit Pusteln
5	angegangen	Schorf	Schorf
6		Schorfe beginnen sich zu lösen	
9		Schorfe abgefallen, Haarwuchs	
27		Haut intakt, starker Haarwuchs	

e) Generalisierung

Virus ENS und Virus ELSTREE boten während des gesamten Versuchs keinerlei Anzeichen der Generalisation auf der Rückenhaut, der Zunge und den sichtbaren Schleimhäuten.

Lediglich die Tiere der FHE (= MVA)-Gruppe zeigten Generalisierung auf der Haut, beginnend am 5. Tag p. V..

Sie äußerte sich in Knötchen von etwa 3 mm Durchmesser, die zum Teil livide verfärbt waren.

Die Zahl schwankte von 2 bis zu etwa 30 auf der enthaarten Haut der einzelnen Kaninchen.

Die Knötchen indurierten, am 8. Tag p. V. verschorfte ein Teil von ihnen, der Rest blieb unverändert.

Die Schorfe fielen am 10. Tag ab, die indurierten Knötchen verkleinerten sich.

Ab dem 11. Tag waren die Knötchen, auch wegen des einsetzenden starken Haarwuchses, nicht mehr zu tasten.

f) Hämagglutinations-Hemmtiter

Die humorale Immunität gegenüber dem Vaccine-Virus vom Stamm ELSTREE wurde am 14. und am 23. Tag p. V. mit Hilfe des HAH-Titers geprüft.

Bild 11 HAH-Titer

	Tier-Nr.	14. Tag p. V.	23. Tag p. V.
	131	1:128	1:128
	130	1:128	1:512
FHE	129	1:256	1:1024
(= MVA)	128	1:256	1:512
	127	1:64	1:64
	136	0	0
	135	0	0
ENS	134	0	0
	133	0	0
	132	0	0
	200	1:64	1:128
	140	1:32	1:64
ELSTREE	139	1:32	1:16
	138	1:64	1:64
	137	1:16	1:64

g) Leukozytolysereaktion

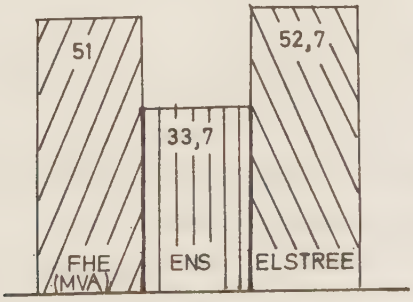
Zum Nachweis der Vaccinia-spezifischen Gewebsimmunität wurde bei 3 Tieren eines jeden Versuchskollektivs die Leukozytolyse durchgeführt. Gleichzeitig wurden auch 3 der nicht immunisierten Tiere untersucht.

Der Leukozytolyse-Index ist der Anteil der gelösten Zellen in Prozent der Zellzahl des Versuchsansatzes.

20. Tag p. V.

	FHE (= MVA)	ENS	ELSTREE	nicht immun
Leuko-	55 %	33 %	54 %	2 %
lyse-	50 %	37 %	53 %	1 %
Index	48 %	31 %	49 %	11 %

Bild 12 Mittlere Werte der Leukozytolyse



h) Wiederimpfreaktion

Die letzte Kontrolle der Immunität stellte die Beobachtung der Wiederimpfreaktion dar. Es sollte gezeigt werden, wie die verschiedenen, mit FHE (= MVA)-, ENS- und ELSTREE-Impfstoff vorimmunisierten Tiere auf eine Nachimpfung mit ELSTREE-Impfstoff cutan und intracutan reagieren.

Das Vacciniavirus für den Belastungstest stammte wiederum vom Trockenimpfstoff aus der laufenden Produktion der Impfanstalt, 117/ER.

Die Impfung erfolgte am 27. Tag p. V. cutan und intracutan in Konzentrationen von 10^7 mit 10^2 VE/ml. Die intracutanen Quaddeln enthielten 0,1 ml der jeweiligen Virussuspension, die Schnitte waren 3 - 4 cm lang.

Die Quaddeln begannen sich ab dem 2. Tag p. V. dosisabhängig zu verändern. Merkliche Verdickung zeigten sie bei allen Versuchsgruppen nur bei den Konzentrationen 10^7, 10^6 und 10^5 VE/ml. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren minimal. Nach dem 4. Tag verkleinerten sich die Quaddeln wieder; Nekrosen, Verschorfung oder Verkrustung zeigten sich nicht.

Die Schnittimpfung ging bei allen Gruppen bis zu einer Konzentration von 10^5 VE/ml an.

Die Veränderungen boten das Bild einer Wiederimpfreaktion. Am 3. Tag erschienen kleine Papeln die sich bereits am 4. Tag in kleine Schorfe verwandelt hatten.

Einen Unterschied in der Reaktion bewies nur der Schorfabfall. Bei den mit ELSTREE vorimmunisierten Tieren begann er am 5. Tag, die Schorfe der mit FHE (= MVA) und ENS vorimmunisierten Kaninchen hafteten bis zum 10. Tag.

Zwischen dem 1. und dem 10. Tag nach der Wiederimpfung gingen 2 Versuchstiere ein, eines aus der FHE (= MVA)-Gruppe und das andere aus der ENS-Gruppe. Die Sektion ergab keinerlei Hinweis auf eine Virus-bedingte Veränderung, es handelte sich in beiden Fällen um Coccidiose.

2. Immuntransfer von immunen Mäusen auf nicht immune Säuglingsmäuse

a) Immunisierung der erwachsenen Spendermäuse

Erwachsene Mäuse vom Stamm NMRI wurden 3mal im Abstand von 7 Tagen mit dem Virus FHE (= MVA) immunisiert. Die Vergleichsgruppe bekam Vaccinia-Virus ELSTREE; ferner standen unbehandelte Tiere zur Verfügung. Die Tiere wurden intraperitoneal mit 0,5 ml der jeweiligen Virussuspension geimpft; der Titer betrug beidemale 10^6 VE/ml.

Impfviren waren: FHE/MVA 517/IV, 3. Eipassage
ELSTREE 117/ER Trockenimpfstoff

7 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Spendermäuse getötet, entblutet, und die Milzen wurden steril gewonnen.

Das aus dem Blut gewonnene Serum blieb unverdünnt; die Milzen wurden vorsichtig durch ein Sieb gestrichen, so daß Zellsuspensionen etwa gleicher Konzentration entstanden.

In 0,2 ml (der verimpften Menge) waren enthalten:

FHE (MVA)-immune Spendertiere	$3,5 \times 10^7$ Zellen
ELSTREE-immune Spendertiere	$5,2 \times 10^7$ Zellen
nicht-immune Spendertiere	$4,7 \times 10^7$ Zellen

Vor der Immunisierung war an anderen Säuglingsmäusen die tödliche Dosis des zur Belastungsinfektion zu verwendeten Vaccinevirus ELSTREE austitriert worden. Die Pathogenität des Virus ist stark abhängig vom Alter der infizierten Tiere.

Alter (Tage)	VE/Maus
4	10^4
5	10^4
6	10^5
7	10^6
8	10^6

b) Immunisierung der Säuglingsmäuse mit Zellen (adoptiv) und Serum (passiv)

Die jungen Mäuse wurden in ihrer Altersgruppe gemischt und jeder Mutter 12 gleichaltrige Junge gegeben.

Diese wurden in 6 Gruppen aufgeteilt.

FHE (= MVA)-immun	Serum
	Zellen
ELSTREE-immun	Serum
	Zellen
nicht immun	Serum
	Zellen

Nach der Kennzeichnung der Gruppen wurde den Mäusen Serum oder Zellsuspension intraperitoneal verabreicht. Jedes Tier bekam 0,2 ml. Die Gesamtzahl war bei 14 Würfen zu je 12 Tieren insgesamt 168 Säuglingsmäuse.

Vom Serum der FHE- und der ELSTREE-immunisierten Spendermäuse wurde zugleich noch der HAH-Titer bestimmt.

FHE: Ø (MVA) ELSTREE: 1:16

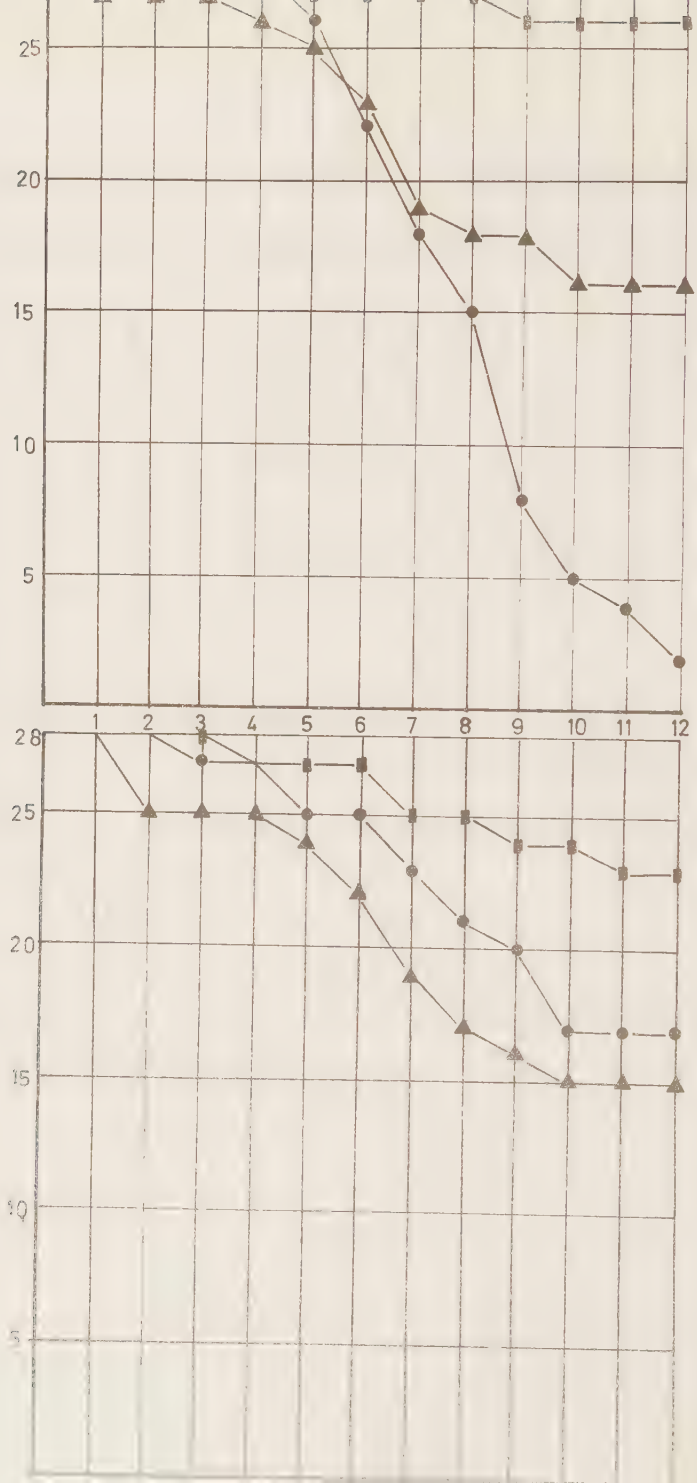
Am Tag nach der passiven und adoptiven Immunisierung wurde die Belastungsinfektion in den vorher austitrierten Dosen mit dem Vaccinia-Virus ELSTREE intraperitoneal durchgeführt.

Bild 13 Anzahl der überlebenden Mäuse

Die lebenden Säuglingsmäuse wurden täglich gezählt.

FHE (= MVA)	Serum	27	27	27	26	25	23	19	18	18	16	16	16
	Zellen	28	25	25	25	24	22	19	17	16	15	15	15
ELSTREE	Serum	28	28	28	28	27	27	27	27	26	26	26	26
	Zellen	28	28	28	27	27	27	25	25	24	24	23	23
nicht immun	Serum	28	28	28	28	26	22	18	15	8	5	4	2
	Zellen	28	28	27	27	25	25	25	23	21	17	17	17

Bild 14 Überlebende Tiere an den Tagen nach der Belastungsinfektion (siehe Seite 30).


Serum
25
20
15
10
5
▲ FHE(MVA)
▮ ELSTREE
● nicht immun
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 Tage p. I.
28
25
20
15
10
5
Zellen

3. Immuntransfer von immunen Mäusen auf embryonierte Hühnereier

a) Immunisierung der erwachsenen Mäuse

Die Mäuse bekamen 3mal im Abstand von 6 Tagen 0,5 ml einer Virussuspension von FHE (= MVA) oder ELSTREE intraperitoneal injiziert. Die Konzentration betrug 10^6 VE/ml.

b) Gewinnung der Milzzellen

6 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere entblutet, und die Milzen wurden steril gewonnen. Aus dem Serum wurde der HAH-Titer bestimmt; die Milzen wurden vorsichtig zerrieben, und mit gepufferter Kochsalzlösung wurde eine Zellsuspension hergestellt.

c) Versuchsansatz

Wieder wurden 3 Gruppen gebildet.
THE (= MVA), ELSTREE, und nicht immune Zellen wurden auf gleiche Konzentrationen gebracht, 10^4, 10^5, 10^6 und 10^7 Zellen pro ml.

In jeder Konzentration wurden 9 Eier verwendet. Die Chorionallantoismembran wurde gesenkt und darauf 0,1 ml der Zellsuspension gegeben. Die Eier wurden nach 60 Minuten mit Vaccinevirus ELSTREE beimpft.

Die Konzentration des Virus betrug 10^3 VE/ml, was bei einer Impfmenge von 0,1 ml auf ein unbehandeltes Ei 100 Herde erwarten ließ.

Die Eier wurden mit einem Paraffintropfen verschlossen und 2 Tage weiterbebrütet. Dann wurden die CAM gewonnen und die Herde ausgezählt.

d) Ergebnisse

Von den 108 Eiern, die im Versuch waren, konnten 38 nicht zur Errechnung der Mittelwerte herangezogen werden, weil die Herde konfluierten, oder die Embryonen abgestorben waren.

Bild 15 Herdzahlen nach Immuntransfer am Ei

	mittlere Herdzahlen	Milzzellen pro Ei
FHE (= MVA)	46	10^3
	86	10^4
	55	10^5
	75	10^6
ELSTREE	54	10^3
	41	10^4
	63	10^5
	69	10^6
nicht immun	45	10^3
	56	10^4
	75	10^5
	75	10^6

IV. Diskussion

Seit der Einführung der Pockenschutzimpfung findet diese auf der Haut statt. Ihr Erfolg wird, soweit er einer Bestätigung bedarf, an der Reaktion der Haut abgelesen. Es liegt nahe, das Verhalten eines Vakzinevirus zunächst in seiner Vermehrung und in seinen pathologischen Veränderungen auf der Haut eines geeigneten Versuchstieres zu erproben (1).

Die Vacciniaviren "FHE bzw. MVA" und "ENS" wurden cutan und intracutan am Kaninchen verimpft. Zum Vergleich diente die in der Bayer. Landesimpfanstalt München hergestellte Dermovakzine vom Stamm ELSTREE.

Ein zahlenmäßig auszudrückendes Maß für den Grad der entzündlichen Veränderungen der Haut sollte die Zunahme der Hautdicke an den intracutanen Quaddeln sein, die über die Substanzzunahme durch die injizierte Virussuspension hinausging.

Das als Vergleich benutzte Virus ELSTREE zeigte, daß am Tag der ausgeprägtesten Reaktion die Hautdicke gleichmäßig mit der injizierten Viruskonzentration zunahm (Bild 5).

Man kann also davon ausgehen, daß die Dickenzunahme der Haut ein Gradmesser ist für die jeweils injizierte Virusmenge in die Haut des Versuchstieres. Das Vaccinia-Virus FHE (= MVA) zeigte nun die größte Hautdicke nicht an der Stelle seiner höchsten Konzentration, sondern bei einem Zehntel davon (Bild 5). Die entzündlich-pathologischen Veränderungen nahmen demzufolge nicht in gleichem Verhältnis zu wie die Konzentration des Virus.

Wodurch sich diese Verschiebung ergeben hat, ist nicht zu ersehen: - gegenseitige Behinderung der höher konzentrierten Viruspartikel am Zellrezeptor oder Abwehrreaktion des Gewebes mit Interferon-Induktion?

Sind einmal ausgedehnte Nekrosen um die Injektionsstellen entstanden, so ist die Hautdicke kein alleiniges Kriterium für entzündliche Veränderungen mehr; denn die Haut wird dünner, obwohl noch keinerlei Heilungstendenz erkennbar ist.

Die Beobachtung der Quaddeln (Bild 6) zeigt, daß die Defekte bei Infektion mit Virus ELSTREE bedeutend schneller abheilen, die Infiltrate bei ENS zurückgehen und daß die Schorfe bei FHE (= MVA) hartnäckig haften. Der vergebliche Versuch, sie vorzeitig abzulösen, macht deutlich, wie tief die Nekrosen in die Haut reichen.

Ein ähnliches Bild wie an den Quaddeln bietet die Haut an den Schnitten.

Auch hier führte die Infektion mit FHE (= MVA) zu schweren Nekrosen, die nur langsam abheilten (Bilder 8 und 9). Trotzdem geht FHE (= MVA) nur in hohen Konzentrationen an (Bild 7).

Die Reaktion auf ENS ist die mildeste.

Gemeinsam ist FHE (= MVA) und ENS, daß sie keine Pusteln erzeugen.

Beim Kaninchen kommt es zu einer Generalisierung nur bei Infektion mit dem Virus FHE (= MVA).

Wertet man die Wiederimpfreaktion aus, so nimmt man dabei die Tatsache, daß nach einer Wiederimpfung mit bekannter Vakzine die vaccinalen Efflores-zenzen schneller abheilen, zum Indiz für eine erhöhte vaccinale Reaktionsbereitschaft (vaccinale Allergie). Allerdings erhält man dabei keinen Aufschluß, über welchen Mechanismus diese Reaktionsbeschleunigung abläuft (11), - Immunität im Sinne einer schnelleren Inaktivierung des eingedrungenen Allergens oder allergiebedingte Gegenantworten.

Angewandt auf FHE (= MVA) und ENS heißt das, daß sie gegen ELSTREE immunisieren bzw. allergisieren, aber nicht in demselben Maße wie ELSTRE wie die etwas verzögerte Reaktion zeigt. Dies darf nicht verwundern, da bei Immunisierung und Belastung mit dem gleichen Antigen die Kompetenz am strengsten sein muß.

Serologische (HAH-Titer) und zytologische (Leukozytolyse) Reaktionen sollten einen Hinweis geben, über welchen Mechanismus die Immunität zustande kommt.

Als einziges der Viren bildet ENS keinen HAH-Titer, obwohl, nach Betrach-

tung der Wiederimpfreaktion, zweifellos eine spezifische Reaktionsbereitschaft vorhanden sein muß.

So kann die durch ENS angeregte Immunität eine rein zellulär bedingte sein, wobei sich zeigte, daß sie bereits ausreichend ist (13, 2, 3).

Oder die humorale Immunität ist nicht von der Art der Hämagglutinations-hemmenden Antikörper, oder die Agglutinations-hemmenden Antikörper auf ENS sind nicht in der Lage, die Agglutination durch das Testantigen ELSTREE zu hemmen; sensibilisierte Leukozyten treten aber nach Gabe von ELSTREE-Antigen in Lyse (vgl. "Allergozytolyse-Reaktion"). Immunserum und immunkompetente Zellen eines immunisierten Spenders können, auf einen Empfänger übertragen, diesen gegen eine zu den Immunkörpern korrespondierende Infektion schützen.

Die adoptive Immunisierung mit den Milzzellen von Spendern, die mit dem Vaccinia-Virus vom Stamm ELSTREE immunisiert waren, wirkte, wie zu erwarten, schützend gegen eine Belastungsinfektion mit dem gleichen Virus. Die Zellen von Spendern, die mit dem Virus FHE (= MVA) immunisiert waren, schützten gegen die gleiche Belastungsinfektion nicht besser als die Zellen nicht immunisierter Tiere.

Auch der Immuntransfer mit Milzzellen auf die CAM bebrüteter Hühnereier zeigte keine deutliche Hemmung des Wachstums der nachher aufgebrachten Viren, wie dies bei der Immunisierung von Kaninchen beobachtet worden war (11).

Dazu kommt, daß das Virus FHE (= MVA) bei den immunisierten Spendermäusen keine Hämagglutinations-hemmenden Antikörper entstehen ließ.

Selbst wenn man annimmt, daß mit der Agglutinationshemmung nicht alle vaccinalen Antikörper zu erfassen sind, so hätten diese anderen Antikörper sich doch irgendwie auswirken müssen.

Auch die Immunzellen der Milz hätten die Säuglingsmäuse schützen oder die Virusvermehrung auf dem Ei hemmen müssen, über den gezeigten, wohl unspezifischen Effekt hinaus.

V. Zusammenfassung

Vaccinia-Virus wurde über Zellkulturpassagen derart modifiziert, daß es gegenüber dem Ausgangsstamm, wie gegenüber dem Virus des konventionellen Impfstammes ELSTREE ein anderes biologisches Verhalten aufwies. Auch untereinander zeigten die modifizierten, hier untersuchten Varianten unterschiedliches Verhalten im Tierversuch:

1. ENS, ein über Schweinenierenzellen modifiziertes Vaccinia-Virus führt cutan und intracutan auf der Kaninchenhaut zu einer milden Reaktion, FHE (= MVA), über Hühnerfibroblasten-Kulturen modifiziertes Vaccinia-Virus, zu ausgedehnten hämorrhagischen Nekrosen mit tiefen Hautdefekten. FHE neigt zur Generalisation.

2. ENS bildet keine Antikörper, um die Agglutination durch ELSTREE zu hemmen. Leukozytolyse findet statt. FHE (= MVA) regt beim Kaninchen die Bildung hoher Antikörpertiter an.

3. Durch intraperitoneale Immunisierung von Mäusen mit der Vaccinia-Virus-Variante FHE (= MVA) lassen sich keine Milzzellen mit Immuneigenschaften und kein Immunserum gegen Vaccinia-Virus ELSTREE gewinnen.

VI. Schrifttum

1 FENNER, F.: The biological characteristics of several strains of vaccinia, cowpox and rabbitpox viruses.
Virology. 5, 502 (1958)

2 FRIEDMAN, R. M.: The role of anibody, delayed hypersensitivity and Interferon production in recovery of guinea pigs from primary infektion with vaccinia virus. J. exp. Med. 116, 347 (1962)

3 GLASGOW, L. A., and HABEL, K.: Interferon production by mouse leucocytes in vitro and in vivo.
J. exp. Med. 117, 149 (1963)

4 HERRLICH, A., und MAYR, A.: Vergleichende Arbeiten über die "Vaccine-Kuhpocken-Viren".
Arch. Hyg. 138, 479 (1954)

5 HERRLICH, A., EPP, Chr., und MAYR, A.: Tierexperimentelle Prüfung verschiedener Pockenimpfstoffe im Variola-Belastungsversuch an der weißen Maus.
Z. Imm.-forsch. 135, 237 (1968)

6 HIRST, G. K.: The quantitative determination of influenza virus antibodies by means of red cell agglutination.
J. exp. Med. 75, 49 (1942)

7 HOCHSTEIN-MINTZEL, V.: Passive und adoptive Immunisierung der Säuglingsmaus gegen Poxvirus Vacciniae und Variolae: Ein Beitrag zur Wertigkeitsprüfung von Pockenimpfstoffen. Z. f. Immunitätsforsch., Allergie und klin. Immunol. 138, 71 (1969)

8 JOHN, T. J.: Properties of the CV 1 strain of Vaccinia Virus. I Studies in cell culture. Arch. Virusforsch. 26, 209 (1969)

9 JOHN, T. J.: Properties of the CV 1 strain of Vaccinia Virus. II Studies in Eggs and Mice. Arch. Virusforsch. 26, 366 (1969)

10 KEMPE, C. H.: First International Conference of Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man. Pan American Health Organization, regional office of the World Health Organization, Washington D. C. 1967

11 MAHNEL, H., und MUNZ, E.: Diaplazentare und trophogene Übertragung der Variola-Immunität bei der weißen Maus. Z. Hyg. 150, 340 (1965)

12 MAHNEL, H.: Tierexperimentelle Untersuchungen mit Vakzine-Antigen. Arch. Virusforsch. 10, 529 (1960)

13 MANNWEILER, E., und GEISLER, R.: Untersuchungen über die humorale Antikörperbildung bei Wiederimpfung mit Vakzinevirus. Zbl. Bakt. I Orig. 200, 421 (1966)

14 MAYR, A.: Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpokkenviren. Arch. Virusforsch. 6, 439 (1955)

15 MAYR, A., und MUNZ, E.: Veränderungen von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen. Zbl. Bakt. I Orig. 195, 24 (1964/65)

16 MAYR, A.: Eine einfache und schnelle Methode zur Differenzierung zwischen Vaccine-(Poxvirus officinale) und Kuhpockenvirus (Poxvirus bovinus). Zbl. Bakt. I Orig. 199, 144 (1966)

17 NOORDA, VAN DER, J., DEKKING, F., POSTHUMA, J., and BEUNDERS, B.J.W.: Primary vaccination with an attenuated strain of vaccinia-virus. Arch. Virusforsch. 22, 210 (1967)

18 PARKER, R. F., BRONSON, L. H., and GREEN, R. H.: Further studies of the infectious unit of vaccinia. J. exp. Med. 74, 263 (1941)

19 RIVERS, T. M.: Further observations on the cultivation of vaccinia virus for Jennerian prophylaxis in Man. J. exp. Med. 58, 635 (1933)

20 RIVERS, T. M., WARD, S. M., and BAIRD, R. D.: Amount and duration of Immunity induced by intradermal inoculation of cultured vaccinia virus. J. exp. Med. 69, 857 (1939)

21 SALK, J. E.: A simplified procedure for titrating haemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. J. Immunol. 49, 87 (1944)

22 STICKL, H. und ENGELHARDT, J.: Die Leukozytolyse als Zeichen der spezifischen Reaktionsfähigkeit der Gewebe nach der Pockenschutzimpfung. Z. Hyg. 151, III (1965)

23 STICKL, H., und GROTHEMEYER, P.: Vaccinaler Immuntransfer mit Zellfraktionen immunkompetenter Zellen. Z. med. Mikrobiol. und Immunol. 154, 80 (1968)

24 STICKL, H.: Versuche zur Belastbarkeit einer auf Zellkulturen übertragenen vaccinalen Immunität mit Variola-Virus. Ein Beitrag zur Wertbemessung von Pockenimpfstoffen. Zbl. Bakt. I Orig. 208, 471 (1968)

Bei Herrn Prof. Stickl und seinen Mitarbeitern in der Bayer. Landesimpfanstalt bedanke ich mich für die liebenswürdige Unterstützung und die angenehmen Arbeitsbedingungen.

Lebenslauf

Am 3. April 1946 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Blasius Freytag und seiner Ehefrau Anna Maria, geb. Metzger, in München geboren. Von 1952 an besuchte ich die Volksschule, von 1956 an die neusprachliche Abteilung des Wittelsbacher Gymnasiums, wo ich 1965 die Reifeprüfung ablegte. Im selben Jahr begann ich das Studium der Tiermedizin. Nach dem dritten Semester trat ich zum Studium der Humanmedizin über, auf das mir meine tiermedizinischen Semester und der naturwissenschaftliche Teil der Vorprüfung angerechnet wurden.

Nach weiteren 10 Semestern Humanmedizin schloß ich im Juni 1972 mit der ärztlichen Prüfung ab.